

26. 4. 2004

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

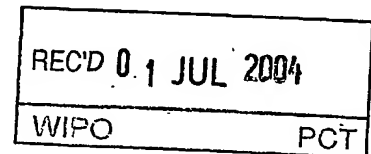
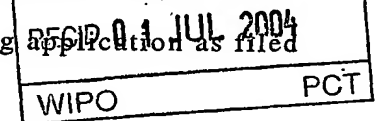
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application: 2003年 4月28日

出願番号  
Application Number: 特願2003-124344  
[ST. 10/C]: [JP 2003-124344]

出願人  
Applicant(s): 積水化学工業株式会社

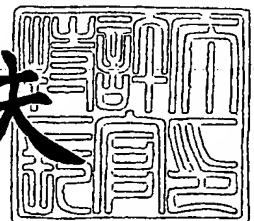


PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 6月 3日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 03P00734

【提出日】 平成15年 4月28日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C07G 17/00

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町百山 2 - 1 積水化学工業株式会社  
内

【氏名】 北原 慎一郎

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町百山 2 - 1 積水化学工業株式会社  
内

【氏名】 新村 和夫

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町百山 2 - 1 積水化学工業株式会社  
内

【氏名】 阿部 佳子

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町百山 2 - 1 積水化学工業株式会社  
内

【氏名】 栗山 澄

【特許出願人】

【識別番号】 000002174

【氏名又は名称】 積水化学工業株式会社

【代表者】 大久保 尚武

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 005083

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 サイトカイン誘導材料及びサイトカイン誘導用具

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 溶連菌及び／又は溶連菌由来成分と、水に不溶性の誘導増強剤とを含むことを特徴とするサイトカイン誘導材料。

【請求項 2】 溶連菌及び／又は溶連菌由来成分は、誘導増強剤に固定化されていることを特徴とする請求項 1 記載のサイトカイン誘導材料。

【請求項 3】 溶連菌及び／又は溶連菌由来成分は、物理吸着で誘導増強剤に固定化されていることを特徴とする請求項 2 記載のサイトカイン誘導材料。

【請求項 4】 溶連菌及び／又は溶連菌由来成分が物理吸着で誘導増強剤に固定化される際において、ホルマリンを含有する溶液中で前記誘導増強剤に固定化されることを特徴とする請求項 3 記載のサイトカイン誘導材料。

【請求項 5】 誘導増強剤は、高分子材料からなることを特徴とする請求項 1、2、3 又は 4 記載のサイトカイン誘導材料。

【請求項 6】 誘導増強剤は、中心線平均粗さ  $R_a$  値が  $0.2 \sim 10 \mu m$  である表面を有することを特徴とする請求項 1、2、3、4 又は 5 記載のサイトカイン誘導材料。

【請求項 7】 誘導増強剤は、ポリスチレン系、アクリルエステル系、ポリエステル系、ナイロン系、セルロース系、及び、ポリビニルアルコール系の各高分子材料からなる群から選択される少なくとも 1 種の高分子材料からなることを特徴とする請求項 1、2、3、4、5 又は 6 記載のサイトカイン誘導材料。

【請求項 8】 誘導されるサイトカインが、インターフェロン $\gamma$ 、インターロイキン 2、インターロイキン 10、インターロイキン 12、腫瘍壊死因子 $\alpha$ 、及び、トランスフォーミング増殖因子 $\beta$ からなる群から選択される少なくとも 1 種のサイトカインであることを特徴とする請求項 1、2、3、4、5、6 又は 7 記載のサイトカイン誘導材料。

【請求項 9】 容器と、容器内に収納された請求項 1、2、3、4、5、6、7 又は 8 記載のサイトカイン誘導材料とを有することを特徴とするサイトカイン誘導用具。

【請求項 10】 容器内に収納されたサイトカイン誘導材料は、血液又は血液成分と接触することを特徴とする請求項 9 記載のサイトカイン誘導用具。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、サイトカイン誘導療法等に用いられ、効果的にサイトカインを誘導し得るサイトカイン誘導材料及び誘導用具に関する。

【0002】

【従来の技術】

サイトカインは、多種多様な細胞間情報伝達因子の総称である。サイトカインとしては、例えば、インターフェロン $\alpha$ 、インターフェロン $\beta$ 、インターフェロン $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )、インターロイキン 1～インターロイキン 27、腫瘍壊死因子- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ 、TNF- $\alpha$ )、腫瘍壊死因子- $\beta$  (Tumor Necrosis Factor- $\beta$ )、トランスフォーミング増殖因子- $\alpha$  (Transforming Growth Factor- $\alpha$ )、トランスフォーミング増殖因子- $\beta$  (Transforming Growth Factor- $\beta$ 、TGF- $\beta$ )、及び、各種細胞増殖因子等が挙げられる (非特許文献 1、非特許文献 2、非特許文献 3)。

【0003】

サイトカインは生体内で様々な活性を有し、様々な疾患に関与していることが知られている。このようなサイトカインの活性を生体内で惹起して疾患の治療を行う、サイトカイン誘導療法が従来より行われている。サイトカイン誘導療法では、患者に、サイトカイン誘導剤を投与し、生体内においてサイトカインの誘導を引き起こす。このようなサイトカイン誘導療法に用いられるサイトカイン誘導物質として、様々な物質が知られている。例えば、微生物由来の OK-432、BCG、ベスタチン、丸山ワクチン、又は、ロムリチド等が知られており、担子菌類由来のサイトカイン誘導物質として、クレスチン、レンチナン、又は、シゾフィラン等が知られている。

【0004】

例えば、OK-432やBCG等は血液等からインターロイキン1やインターフェロン $\gamma$ 等のサイトカインを誘導することが知られている（非特許文献4、非特許文献5）。

#### 【0005】

上述したサイトカイン誘導療法では、生体内でサイトカインを誘導することはできるが、充分量のサイトカインを誘導することが困難であり、強い効力を発揮させ難いという問題があった。また、サイトカインを効果的に誘導するために、サイトカイン誘導剤の投与量が多くなり、副作用が大きくなり、治療を有効に行い得ないという問題もあった。

#### 【0006】

下記特許文献1にはインターロイキン1、OK-432、遺伝子組み換えインターロイキン2、又は、 $\gamma$ -インターフェロンを不溶性担体に共有結合で結合してなる癌治療用白血球刺激材が示されている。これらは腫瘍障害性細胞を誘導するものであり、これらの先行技術ではサイトカイン誘導については全く述べられていない。また、この先行技術では、不溶性担体は、上記の4種類の物質を固定化するためにだけ用いられているものであり、本発明のような効果の増強については全く述べられていない。

#### 【0007】

##### 【非特許文献1】

臨床免疫第27巻特別増刊号1995年「サイトカインのすべて」科学評論社

##### 【非特許文献2】

臨床免疫第36巻、39-44、2001年

##### 【非特許文献3】

臨床免疫第39巻、189-200、2003年

##### 【非特許文献4】

岐阜大医紀43:166-177、1995年

##### 【非特許文献5】

Molecular medicine Vol. 36、臨時増刊号、220-229、1999年

**【特許文献1】**

特開昭61-277628号公報

**【0008】****【発明が解決しようとする課題】**

本発明は、上記現状に鑑み、従来のサイトカイン誘導療法に比べてより効果的にサイトカインを誘導し得る新規なサイトカイン誘導材料及びサイトカイン誘導用具を提供することを目的とする。

**【0009】****【課題を解決するための手段】**

本発明は、溶連菌及び／又は溶連菌由来成分と、水に不溶性の誘導増強剤とを含むサイトカイン誘導材料である。

本願発明者らは、溶連菌及び／又は溶連菌由来成分とともに、水に不溶性の誘導増強剤を含むサイトカイン誘導材料、又は、溶連菌及び／又は溶連菌由来成分が固定化された水に不溶性の誘導増強剤からなるサイトカイン誘導材料が、著しく高いサイトカイン誘導量を示すことを見だし、本発明を完成した。

以下に本発明を詳述する。

**【0010】**

本発明のサイトカイン誘導材料は、溶連菌及び／又は溶連菌由来成分と、水に不溶性の誘導増強剤とを含む。

上記誘導増強剤としては特に限定されず、水に不溶性であればよく、例えば、金属、有機物又は無機物等により構成され、好ましくは有機物材料、より好ましくは高分子材料からなる。

**【0011】**

上記金属としては、例えば、金若しくは金合金、銀若しくは銀合金、チタン若しくはチタン合金、又は、ステンレス等が挙げられる。

上記無機物としては、例えば、活性炭、ガラス又はガラスの誘導体、シリカ系組成物、アルミナ、ヒドロキシアパタイト等が挙げられる。

**【0012】**

上記有機物材料又は高分子材料としては、例えば、セルロース系、アガロース系

、デキストラン系、ポリスチレン系、アクリルエステル系、ポリエチレンテレフタレート系、ナイロン系、ポリビニルアルコール系、ポリスルホン系、ポリアミド系、ポリアクリロニトリル系、ポリエチレン系、ポリウレタン系、ポリプロピレン系、ポリエステル系等の材料が挙げられる。

#### 【0013】

上記ポリスチレン系の材料としては、例えば、ジビニルベンゼン-スチレン共重合体等が挙げられ、アクリルエステル系の材料としては、例えば、ポリメチルメタクリレート、ポリヒドロキシエチルメタクリレート等が挙げられる。

上記誘導増強剤としては、なかでも、ポリスチレン系、アクリルエステル系、ナイロン系、ポリエステル系、セルロース系、ポリビニルアルコール系の高分子材料からなるものが好ましい。

#### 【0014】

上記誘導増強剤は無極性であり、疎水性であってもよく、この場合、誘導増強剤としては、ポリスチレン系高分子材料等を用いることができる。また、これらの誘導増強剤には表面修飾や表面コーティング等により、表面に親水性を付与することもできる。

#### 【0015】

上記誘導増強剤の形状としては特に限定されず、例えば、繊維状、不織布状、スポンジ状、粒子状、膜状、中空糸状等の公知の形状を用いることができる。

上記誘導増強剤の大きさとしては、粒子状では好ましい下限は  $50\text{ }\mu\text{m}$ 、好ましい上限は  $2\text{ mm}$  であり、繊維状では繊維径が  $10\text{ }\mu\text{m}$  以下であることが好ましく、 $5\text{ }\mu\text{m}$  以下であることがより好ましい。

上記誘導増強剤が繊維状である場合は不織布からなることが好ましく、繊維径は  $3\text{ }\mu\text{m}$  以下であることが好ましい。

#### 【0016】

上記誘導増強剤は、白血球を吸着する材料からなることが好ましく、白血球を吸着する材料としては、例えば、ポリスチレン系、アクリルエステル系、ポリエステル系、ナイロン系、ポリビニルアルコール系、又は、酢酸セルロース等のセルロース系材料からなる高分子材料やガラス系の材料等が挙げられる。



## 【0017】

上記誘導増強剤は、表面粗さを付与された材料からなることが好ましく、その中心線平均粗さ  $R_a$  値は、下限が  $0.2 \mu\text{m}$ 、上限が  $10 \mu\text{m}$  であることが好ましい。

## 【0018】

上記誘導増強剤の表面に  $R_a$  値が  $0.2 \mu\text{m}$  以上の粗さを付与することにより、著しくサイトカインの誘導が増強される。また、この表面粗さのサイトカイン誘導増強作用は、白血球の大きさが  $10 \sim 20 \mu\text{m}$  であることを考えると、白血球に比べて上記  $R_a$  値が非常に小さいため、単なる接触表面積の増大によるものではないと考えられる。

ここで、上記  $R_a$  値とは JIS B0601-1982 における中心線平均粗さである。

## 【0019】

上記誘導増強剤は、更に、凹凸平均間隔  $S_m$  値が下限が  $5 \mu\text{m}$ 、上限が  $200 \mu\text{m}$  である範囲にある凹凸を表面に有する材料からなることが好ましい。

ここで、上記凹凸平均間隔  $S_m$  値は、以下のようにして定義される値である。

## 【0020】

まず、図1に示す粗さ曲線Aの中心線Bに対して、それぞれ、一定の高さ及び深さの位置に上側カウントレベルC及び下側カウントレベルDを引く。次に、下側のカウントレベルDと粗さ曲線Aとが交差する2点間において、上側カウントレベルと粗さ曲線とが交差する点が一回以上存在するときに、一つの山として「山」を定義する。

そして、凹凸平均間隔  $S_m$  値は、図2に示すように、基準長さLの間にある山の間隔を  $S_{mi}$  としたときに、下記の式①で定義される値である。

## 【0021】

## 【数1】

$$S_m = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n S_{mi} \quad (n: \text{山数}) \quad \dots \textcircled{1}$$

## 【0022】

すなわち、凹凸平均間隔  $S_m$  値とは、基準長さ  $L$  の間にある山同士の間隔の平均値を示す。このようにして、凹凸の平均間隔  $S_m$  値により、凸凹の面方向の条件が定義される。

## 【0023】

現在の J I S 規格では、表面粗さの高さ方向の情報については規定されているが、面方向の情報に関しては規定されていない。しかしながら、本発明における表面粗さは、凸凹の面方向における間隔によっても特徴付けられるものである。

## 【0024】

上記誘導増強剤の表面粗さは材料の多孔性等に由来するものであっても良い。上記誘導増強剤に用いられる多孔性高分子材料としては、例えば、ポリスチレン系、アクリルエステル系、ポリエステル系、ナイロン系、セルロース系、ポリビニルアルコール系等の材料が挙げられる。

## 【0025】

上記誘導増強剤の表面粗さは材料の繊維形状に由来するものであっても良く、その場合、上記誘導増強剤としては、繊維状材料又は不織布状材料からなるものが好ましい。上記繊維状材料又は不織布状材料としては、例えば、ポリスチレン系、アクリルエステル系、ポリエステル系、ナイロン系、セルロース系、ポリビニルアルコール系等の高分子材料からなるものが挙げられる。

## 【0026】

上記溶連菌は、ストレプトコックス・ヘモリティクスに属する菌体を意味し、本発明で用いられる溶連菌としては、例えば、ストレプトコックス・ピオゲネス（A 群 3 型）S u 株ペニシリン処理凍結乾燥粉末からなる菌体成分である OK-432 等が挙げられる（特開昭 49-48822 号公報）。また、上記溶連菌由来成分としては、モノクローナル抗体を CNBr 活性化セファロースに結合させた粒子をカラム担体としてアフィニティークロマトグラフ法により抽出・精製した OK-432 由来成分である OK-PSA（J. Immunother. 2000、Jan; 23（1）、94-103）や、溶連菌をメタノール、エタノール、アセトン、酢酸エチル、ジエチルエーテル、ジクロロメタン、クロロホルム等

の有機溶媒に接触させて得られる有機溶媒への可溶性成分、又は、その不溶性成分等が挙げられる。また、溶連菌を水、生理食塩水、リンや、カリウム、マグネシウム、カルシウム等の無機塩が溶解した水溶液に接触させて得られる水溶液への可溶性成分、又は、その不溶性成分等も本発明における溶連菌由来成分に含まれる。

#### 【0027】

また、上記溶連菌及び／又は溶連菌由来成分のみではサイトカイン誘導能を十分に発揮し得ないものであっても、上記水に不溶性の誘導増強剤と組み合わせて用いることにより、サイトカイン誘導活性を発揮させることもできる。

#### 【0028】

上記溶連菌及び／又は溶連菌由来成分を上記誘導増強剤の表面に固定化する場合は、物理吸着、共有結合、イオン結合等の公知の方法を用いることができるが、固定化方法の簡便さから物理吸着が好ましい。また、共有結合等の場合には必要に応じて、上記溶連菌及び／又は溶連菌由来成分と、誘導増強剤との結合部に任意の長さをもつスペーサーを導入することもできる。

#### 【0029】

上記溶連菌及び／又は溶連菌由来成分は、必要に応じて、固定化する前に菌体の洗浄操作や破碎操作、成分分画操作等のさまざまな前処理が施されてもよい。OK-432は増殖能を有さない生菌であるが、より安全性を高めるために、必要に応じて、固定化する前、固定化と同時、又は、固定化の後のいずれの時点でも、加熱処理、薬品処理、放射線処理、ガス滅菌処理等のさまざまな方法により死菌化してもよい。上記加熱処理としては、例えば、オートクレーブ処理が挙げられ、上記薬品処理としては、例えば、グルタルアルデヒド処理、ホルマリン処理、又は、エタノール処理が挙げられ、上記放射線処理としては、例えば、 $\gamma$ 線処理が挙げられ、上記ガス滅菌処理としては、エチレンオキシドガス処理等が挙げられる。これらの処理のうち、薬品処理であるホルマリン処理が、従来より消毒液等として使われており、安全で、かつ、菌体自身を極めて安定化するため好ましい。

#### 【0030】

上記溶連菌及び／又は溶連菌由来成分を上記誘導増強剤に固定化する場合には、菌体表面外壁成分のアミノ酸や糖成分等を介して、上記誘導増強剤のカルボキシル基、アミノ基及び／又はエポキシ基等の官能基に結合してもよい。この際、必要に応じてさまざまな鎖長や構造のスペーサーを導入することもできる。

#### 【0031】

上記溶連菌及び／又は溶連菌由来成分を、上述した前処理により、その表面が電荷を帯びている状態にした場合には、その対極電荷を表面に有する誘導増強剤にイオン結合作用によって固定化することもできる。

#### 【0032】

上記誘導増強剤の使用割合としては特に限定されないが、粒子状の誘導増強剤として用いる場合には、血液容積に対する誘導増強剤のかさ体積量として、下限は0.02%、上限は80%程度であり、好ましい下限は0.1%、好ましい上限は50%程度である。

#### 【0033】

上記溶連菌及び／又は溶連菌由来成分の使用割合としては特に限定されないが、例えば、OK-432を用いる場合は、血液に添加される濃度として、下限は0.0001KE/mL、上限は10KE/mLであることが好ましい。

#### 【0034】

本発明のサイトカイン誘導材料を容器内に収容することによりサイトカイン誘導用具を作成することができる。容器と、容器内に収納された本発明のサイトカイン誘導材料とを有するサイトカイン誘導用具もまた、本発明の1つである。

#### 【0035】

本発明のサイトカイン誘導用具では、上記誘導増強剤と溶連菌及び／又は溶連菌由来成分とを含むサイトカイン誘導材料が、容器内にて血液又は血液成分等と接触し、それによって血液又は血液成分等の中でサイトカインが効果的に誘導される。この場合、接触温度を下限は15℃、上限は42℃の範囲とすることが好ましく、それによって、サイトカインの誘導をより効果的に引き起こすことができる。

#### 【0036】

なお、上記誘導増強剤、並びに、上記溶連菌及び／又は溶連菌由来成分は、予め混合されて血液と接触してもよく、又は、個別に血液若しくは血液成分等と接触してもよい。

また、本発明のサイトカイン誘導用具では、サイトカイン誘導材料を収納する容器の構造は特に限定されないが、図3に模式的に示すように、血液等の導入部1と、サイトカイン誘導材料と接触した血液4等を容器外に導く導出部2とが備えられている容器3が好ましい。

上記容器としては、カラム状の容器や血液バッグ状の容器等がより好ましい。

#### 【0037】

本発明のサイトカイン誘導用具には、サイトカイン誘導材料と接触させた血液等を容器外に導く場合に、サイトカイン誘導材料が血液に混入しないような、サイトカイン誘導材料流出防止機構が備えられていることが好ましい。

#### 【0038】

図3に模式的に示すように、サイトカイン誘導材料流出防止機構5は、サイトカイン誘導材料があらかじめ脱離しないように、収納容器内部に固定化されていても良く、このような場合のサイトカイン誘導材料流出防止機構としては、例えば、流出防止用の分離膜や分離フィルター等が挙げられる。また、その他のサイトカイン誘導材料流出防止機構としては、例えば、遠心操作等によって血液と分離する機構等が挙げられる。

#### 【0039】

必要によっては、サイトカイン誘導材料と接触させた血液等から血漿や血清成分等を分離して治療等に用いてもよい。

本発明のサイトカイン誘導用具の1実施態様としては、例えば、導入部と導出部を有する血液バッグに粒子状・繊維状・不織布状等の誘導増強剤を含む本発明のサイトカイン誘導材料を充填し、ここに血液又は血液成分等を導入する。必要に応じて、サイトカインを誘導した血液又は血液成分等を導出部から取り出し利用することができる。これらの血液バッグの容量としては下限は50mL、上限は1000mLであることが好ましく、より好ましい下限は100mL、より好ましい上限は400mLである。これらの血液バッグは粒子状や繊維状、不織布状

の本発明のサイトカイン誘導材料を収納することが好ましい。

#### 【0040】

本発明のサイトカイン誘導材料又はサイトカイン誘導用具により誘導されるサイトカインとしては特に限定されないが、なかでも、インターフェロン $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )、インターロイキン2 (IL-2)、インターロイキン10 (IL-10)、インターロイキン12 (IL-12)、腫瘍壊死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、トランスフォーミング増殖因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) が好適に挙げられる。例えば、IFN- $\gamma$  はリウマチ等の免疫疾患、炎症性疾患、アレルギー性疾患、癌等のさまざまな疾患において非常に重要な役割を担っているサイトカインであり、IFN- $\gamma$  を誘導することによりこれらの疾患に対する治療効果が期待できる。

#### 【0041】

本発明のサイトカイン誘導材料及びサイトカイン誘導用具は、血液又は血液成分等に限らず、骨髓系細胞、表皮細胞、繊維芽細胞、肝細胞、骨芽細胞、血液幹細胞、胚性幹細胞等の組織から採取した細胞や培養細胞、株化細胞等、サイトカインを産生する様々な細胞からもサイトカインを誘導することができる。

#### 【0042】

##### 【実施例】

以下に実施例を掲げて本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれら実施例のみに限定されるものではない。

#### 【0043】

なお、ヒト及びラット血漿中のIFN- $\gamma$ 、IL-10の測定は、R&D Systems社製ELISAキット、ENDOGEN社製ELISAキット、ジェンザイム・テクネ社製ELISAキットにて行なった。

また、用いた健常人の血液の採血直後及び実施例1と同様に血液のみを培養した後において、血漿中IFN- $\gamma$ の値は全て10 pg/mL以下であった。同様に健常人の血液の採血直後及び実施例1と同様に血液のみを培養した後において、血漿中IL-10の値は全て10 pg/mLであった。同様に、用いたラットの血液の採血直後及び実施例1と同様に血液のみを培養した後において、血漿中IFN- $\gamma$ の値は全て40 pg/mL以下であった。

## 【0044】

## (実施例1)

誘導増強剤1 (芳香族系合成吸着剤、三菱化学社製、商品名: ダイヤイオンHP-50) をメタノール (和光純薬社製、HPLC用) にてデカンテーションにより洗浄し、しかる後精製水 (大塚製薬社製) にてデカンテーションすることにより洗浄した。次に、注射用生理食塩水 (大塚製薬社製) にて誘導増強剤1 をデカンテーションにより洗浄し、粒子かさ体積で  $20\ \mu\text{L}$  の誘導増強剤1 を滅菌済みチューブ (ダイヤアトロン社製、エッペンドルフチューブ  $1.5\ \text{mL}$  用) に充填した。

## 【0045】

健常人から採血し、ヘパリン  $15\ \text{IU/mL}$  含有静脈血を得た。OK-432 (ピシバニール、中外製薬社製) を、 $0.1\ \text{KE/mL}$  の濃度となるように各血液に添加した。なお、OK-432 は、生理食塩水で調製されたものであり、生理食塩水が血液に対して  $1\%$  となるように調製した。OK-432 が添加された血液を、誘導増強剤1 がかさ体積で  $20\ \mu\text{L}$  充填された上記チューブに、チューブの目盛りが  $1.5\ \text{mL}$  となるように添加した。すなわち、血液を約  $1.48\ \text{mL}$  添加した。

## 【0046】

次に、チューブを転倒混和して血液を攪拌し、ロータリーミキサー (TAITEC社製) に取り付け、 $6\ \text{rpm}$  で転倒混和させつつ、 $37^\circ\text{C}$  にて24時間恒温槽中でインキュベートした。インキュベート後の血液を  $4^\circ\text{C}$  で  $3500\ \text{rpm}$  (トミー精工社製、微量高速遠心機MRX-150) で15分間遠心し、しかる後血漿を採取し、 $-20^\circ\text{C}$  で該血漿を凍結保存した。次に、保存された血漿を、融解し、Human IFN- $\gamma$  ELISAキット (R&D System社製又はENDOGEN社製) にて血漿中のIFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表1に示した。

## 【0047】

## (実施例2)

誘導増強剤1 のかさ体積を  $50\ \mu\text{L}$  としたこと、及び、OK-432 添加血液を

1. 45 mL用いたことを除いては、実施例 1 と同様にして I F N- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 1 に示した。

【0048】

(実施例 3)

誘導増強剤 1 のかさ体積を 100  $\mu$ L としたこと、及び、OK-432 添加血液を 1.40 mL 用いたことを除いては、実施例 1 と同様にして I F N- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 1 に示した。

【0049】

(比較例 1)

誘導増強剤 1 を用いなかったことを除いては、実施例 1 と同様にして I F N- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 1 に示した。

【0050】

(比較例 2)

OK-432 を添加しなかったことを除いては、実施例 1 と同様にして、I F N- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 1 に示した。

【0051】

(比較例 3)

OK-432 を添加しなかったことを除いては、実施例 2 と同様にして、I F N- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 1 に示した。

【0052】

(比較例 4)

OK-432 を添加しなかったことを除いては、実施例 3 と同様にして、I F N- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 1 に示した。

【0053】



【表 1】

	誘導増強剤 1 かさ体積 ( $\mu\text{L}$ )	OK-432 の濃度 (KE/mL)	IFN- $\gamma$ 誘導量 (pg/mL)
実施例 1	20	0.1	360
実施例 2	50	0.1	367
実施例 3	100	0.1	323
比較例 1	—	0.1	114
比較例 2	20	—	<10
比較例 3	50	—	<10
比較例 4	100	—	<10

## 【0054】

(実施例 4)

誘導増強剤 1 に替えて、誘導増強剤 2 (ポリスチレン系合成樹脂、オルガノ社製、品番: アンバーライト XAD-2000) を用いたことを除いては、実施例 2 と同様にして、血漿中の IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 2 に示した。

## 【0055】

(実施例 5)

誘導増強剤 2 のかさ体積を  $50\mu\text{L}$  から  $100\mu\text{L}$  に変更したこと及び OK-432 添加血液を  $1.4\text{mL}$  用いたことを除いては、実施例 4 と同様にして、IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 2 に示した。

## 【0056】

(比較例 5)

誘導増強剤 2 を用いなかったこと、及び、OK-432 添加血液を  $1.5\text{mL}$  用いたことを除いては、実施例 4 と同様にして、IFN- $\gamma$  の誘導量を測定した。結果を表 2 に示した。

## 【0057】

(比較例 6)

OK-432 を血液に添加しなかったことを除いては、実施例 4 と同様にして、IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 2 に示した。

## 【0058】

(比較例 7)

OK-432 を血液に添加しなかったことを除いては、実施例 5 と同様にして、

IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 2 に示した。

【0059】

【表 2】

	誘導増強剤 2 かさ体積 ( $\mu$ L)	OK-432 の濃度 (KE/mL)	IFN- $\gamma$ 誘導量 (pg/mL)
実施例 4	50	0.1	251
実施例 5	100	0.1	236
比較例 5	—	0.1	117
比較例 6	50	—	<10
比較例 7	100	—	<10

【0060】

次に、ラット血液におけるサイトカイン誘導について実施例 6、7 及び比較例 8～10 において検討した。

(実施例 6)

実施例 2 と同様にして、かさ体積 50  $\mu$ L の誘導増強剤 1 を充填した滅菌済みチューブを得た。

ウイスターラット (7 週齢、雄、日本 SLC 社より購入) よりヘパリン 15 IU/mL 含有静脈血を採取した。この血液に、0.1 KE/mL 濃度となるように、OK-432 (ピシバニール、中外製薬社製) を添加した。なお、OK-432 は RPMI 培地で調製されたものであり、RPMI 培地が血液に対して 20% となるように調製した。OK-432 が添加された血液を上記誘導増強剤 1 が充填されたチューブに、目盛りが 1.5 mL となるように添加した。

【0061】

以下、実施例 2 と同様にして血漿を採取し、ラット IFN- $\gamma$  定量キット (ジェンザイム・テクネ社製) を用いて IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 3 に示した。

【0062】

(実施例 7)

誘導増強剤 1 のかさ体積を 500  $\mu$ L としたこと、及び、OK-432 添加血液の量を 1.0 mL としたことを除いては、実施例 6 と同様にして、IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 3 に示した。

## 【0063】

(比較例 8)

誘導増強剤 1 を用いなかったこと、及び、OK-432 添加血液を 1.5 mL 用いたことを除いては、実施例 6 と同様にして、IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 3 に示した。

## 【0064】

(比較例 9)

OK-432 を血液に添加しなかったことを除いては、実施例 6 と同様にして、IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 3 に示した。

## 【0065】

(比較例 10)

OK-432 を血液に添加しなかったことを除いては、実施例 7 と同様にして、IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 3 に示した。

## 【0066】

【表 3】

	誘導増強剤 1 かさ体積 ( $\mu$ L)	OK-432 の濃度 (KE/mL)	IFN- $\gamma$ 誘導量 (pg/mL)
実施例 6	50	0.1	251
実施例 7	500	0.1	435
比較例 8	—	0.1	72
比較例 9	50	—	<40
比較例 10	500	—	<40

## 【0067】

(実施例 8～13)

誘導増強剤 3 として、CA フィルム (アートプラス社製、酢酸セルロースフィルム、商品名: アセチフィルム VR-R) を用い、フィルム表面をメチルアルコールで 24 時間、ソックスレー抽出を行って可塑剤を抽出し、フィルムを取り出した後、15 時間風乾後、更に 80℃ で 5 時間乾燥した。その後、ストルアス社 (デンマーク) 製自動研磨機 (商品名: プラノボールペデマックス) に、220、500、1200、2400、及び、4000 メッシュのサンドペーパーを取り付けたものを用いて、上記 CA フィルムを研磨し、両側の表面に表面粗さを持つ

研磨ずみCAフィルムを作製した。このフィルムをメチルアルコールで洗浄後、  
2.5mm×2.5mmの大きさに細片化し、かさ体積で約200 $\mu$ Lとなるよ  
うにはかり取った。これらの細片を注射用生理食塩水で洗浄後、1.5mL用滅  
菌済みチューブに充填した。

## 【0068】

健常人から採血し、ヘパリン15IU/mL含有静脈血を得た。血液に0.1KE/mLの濃度となるように、OK-432（ピシバニール、中外製薬社製）を  
添加し、血液約1.3mLを上記充填チューブに添加し、実施例1と同様にして  
IFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表4に示した。

## 【0069】

（比較例11～16）

OK-432を血液に添加しなかったことを除いては、それぞれ実施例8～13  
と同様にして、IFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表4に示した。

## 【0070】

【表4】

	実施例					
	8	9	10	11	12	13
	未研磨	研磨				
		4000メッシュ	2400メッシュ	1200メッシュ	500メッシュ	220メッシュ
Ra値( $\mu$ m)	0.05	0.05	0.06	0.58	1.28	2.37
Sm値( $\mu$ m)	250	125	31	30	44	57
OK-432濃度 (KE/mL)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
IFN- $\gamma$ 誘導量 (pg/mL)	48	80	87	174	201	194

	比較例					
	11	12	13	14	15	16
	未研磨	研磨				
		4000メッシュ	2400メッシュ	1200メッシュ	500メッシュ	220メッシュ
Ra値( $\mu$ m)	0.05	0.05	0.06	0.58	1.28	2.37
Sm値( $\mu$ m)	250	125	31	30	44	57
OK-432濃度 (KE/mL)	—	—	—	—	—	—
IFN- $\gamma$ 誘導量 (pg/mL)	<10	<10	<10	<10	<10	<10

## 【0071】

(実施例 14～19)

誘導増強剤 4 として、PET フィルム（ユニチカ社製、ポリエチレンテレフタレートフィルム、商品名：エンブレット S-75）を用い、フィルム表面をメチルアルコールで洗浄した。しかる後、ストルアス社（デンマーク）製自動研磨機（商品名：プラノボールペデマックス）に、220、500、1200、2400、及び、4000 メッシュのサンドペーパーを取り付けたものを用いて、PET フィルムを研磨し、両側の表面に表面粗さを持つ研磨済み PET フィルムを作製した。このフィルムをメチルアルコールで洗浄後、2.5 mm×2.5 mm の大きさに細片化し、かさ体積で約 200  $\mu$ L となるようにはかり取った。これらの細片を注射用生理食塩水で洗浄後、1.5 mL 用滅菌済みチューブに充填した。健常人から採血し、ヘパリン 15 IU/mL 含有静脈血を得た。血液に 0.1 KE/mL の濃度となるように、OK-432（ピシバニール、中外製薬社製）を添加し、血液約 1.3 mL を上記充填チューブに添加し、実施例 1 と同様にして IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 5 に示した。

## 【0072】

(比較例 17～22)

OK-432 を血液に添加しなかったことを除いては、それぞれ実施例 14～19 と同様にして、IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 5 に示した。

## 【0073】

【表 5】

	実施例					
	14	15	16	17	18	19
	未研磨	研磨				
		4000 メッシュ	2400 メッシュ	1200 メッシュ	500 メッシュ	220 メッシュ
Ra 値 ( $\mu\text{m}$ )	0.07	0.12	0.19	0.61	1.55	2.24
Sm 値 ( $\mu\text{m}$ )	475	37	126	31	47	77
OK-432 濃度 (KE/mL)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
IFN- $\gamma$ 誘導量 (pg/mL)	51	84	86	168	184	193

	比較例					
	17	18	19	20	21	22
	未研磨	研磨				
		4000 メッシュ	2400 メッシュ	1200 メッシュ	500 メッシュ	220 メッシュ
Ra 値 ( $\mu\text{m}$ )	0.07	0.12	0.19	0.61	1.55	2.24
Sm 値 ( $\mu\text{m}$ )	475	37	126	31	47	77
OK-432 濃度 (KE/mL)	—	—	—	—	—	—
IFN- $\gamma$ 誘導量 (pg/mL)	<10	<10	<10	<10	<10	<10

## 【0074】

(実施例 20～25)

誘導増強剤 5 として、ポリスチレンフィルム（三菱モンサント社製、商品名：サントクリア）を用い、フィルム表面を精製水で洗浄した。しかる後、ストルアス社（デンマーク）製自動研磨機（商品名：プラノボールペデマックス）に、220、500、1200、2400、及び、4000メッシュのサンドペーパーを取り付けたものを用いて、ポリスチレンフィルムを研磨し、両側の表面に表面粗さを持つ研磨済みポリスチレンフィルムを作製した。このフィルムを精製水で洗浄後、2.5mm×2.5mmの大きさに細片化し、かさ体積で約200 $\mu\text{L}$ となるようにはかり取った。これらの細片を注射用生理食塩水で洗浄後、1.5mL用滅菌済みチューブに充填した。

健常人から採血し、ヘパリン15IU/mL含有静脈血を得た。血液に0.1KE/mLの濃度となるように、OK-432（ピシバニール、中外製薬社製）を添加し、血液約1.3mLを上記充填チューブに添加し、実施例1と同様にして

IFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表6に示した。

【0075】

(比較例23～28)

OK-432を血液に添加しなかったことを除いては、それぞれ実施例20～25と同様にして、IFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表6に示した。

【0076】

【表6】

	実施例					
	20	21	22	23	24	25
	未研磨	研磨				
		4000メッシュ	2400メッシュ	1200メッシュ	500メッシュ	220メッシュ
Ra値( $\mu\text{m}$ )	0.06	0.08	0.21	0.72	1.75	2.44
Sm値( $\mu\text{m}$ )	375	52	43	27	39	71
OK-432濃度 (KE/mL)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
IFN- $\gamma$ 誘導量 (pg/mL)	57	105	107	229	253	234

	比較例					
	23	24	25	26	27	28
	未研磨	研磨				
		4000メッシュ	2400メッシュ	1200メッシュ	500メッシュ	220メッシュ
Ra値( $\mu\text{m}$ )	0.06	0.08	0.21	0.72	1.75	2.44
Sm値( $\mu\text{m}$ )	375	52	43	27	39	71
OK-432濃度 (KE/mL)	—	—	—	—	—	—
IFN- $\gamma$ 誘導量 (pg/mL)	<10	<10	<10	<10	<10	<10

【0077】

(実施例26)

酢酸セルロースペレット(アートプラス社製、可塑剤としてアセチルクエン酸トリエチル30%含有)を射出成形し、直径2.5mmの球状ビーズを作製した。このビーズ50gをメタノール300mLにより、50℃で24時間ソックスレー抽出し、可塑剤を抽出した。しかる後、可塑剤が抽出されたビーズをステンレス製バットに取り出し、15時間風乾した後、更に80℃で5時間乾燥させた。

【0078】

ポットミル（東洋エンジニアリング社製、商品名：51-セラミックポットミル BP-5）に、上記ビーズ 200 mL 及び同容量の研磨剤として WHITE ABRA-X (WA) #34（日本研磨材工業社製）を投入し、更にセラミックポットミル用ボール（東洋エンジニアリング社製、商品名：BB-13）数個を投入し、ボール研磨機（日陶科学社製ポットミル、商品名：AN-3S）により 5 時間研磨した。このようにして、Ra 値  $1.36\ \mu\text{m}$  及び Sm 値  $97.2\ \mu\text{m}$  のビーズを得た（誘導増強剤 6）。

#### 【0079】

得られたビーズをメタノールで 3 回洗浄して、注射用生理食塩水で 5 回洗浄した。その後、かさ体積で  $400\ \mu\text{L}$  を実施例 1 と同様にして滅菌済み  $1.5\ \text{mL}$  用チューブに入れ、血液を  $1.1\ \text{mL}$  添加したこと以外は実施例 1 と同様にして、IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 7 に示した。

#### 【0080】

（実施例 27）

実施例 26 と同様にして、但し、非研磨の Ra 値  $0.186\ \mu\text{m}$ 、Sm 値  $298.7\ \mu\text{m}$  の誘導増強剤 6 を作製した。実施例 26 と同様に、血液と接触させ、IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 7 に示した。

#### 【0081】

（比較例 29）

誘導増強剤 6 を用いなかったことと OK-432 添加血液を  $1.5\ \text{mL}$  用いたことを除いては、実施例 26 と同様にして、IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 7 に示した。

#### 【0082】

（比較例 30）

OK-432 を血液に添加しなかったことを除いては、実施例 26 と同様にして、IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 7 に示した。

#### 【0083】

（比較例 31）

OK-432 を血液に添加しなかったことを除いては、実施例 27 と同様にして



、IFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表7に示した。

【0084】

【表7】

	中心線平均粗さ Ra ( $\mu\text{m}$ )	でこぼこ平均間隔 Sm ( $\mu\text{m}$ )	OK-432 濃度 (KE/mL)	IFN- $\gamma$ 誘導量 (pg/mL)
実施例26	1.36	97.2	0.1	288
実施例27	0.186	298.7	0.1	165
比較例29	—	—	0.1	84
比較例30	1.36	97.2	—	<10
比較例31	0.19	298.7	—	<10

【0085】

(実施例28～32)

誘導増強剤1（芳香族系合成吸着剤、三菱化学社製、商品名：ダイヤイオンHP-50）、誘導増強剤2（ポリスチレン系合成樹脂、オルガノ社製、品番：アンバーライトXAD-2000）、誘導増強剤7（芳香族系合成樹脂、オルガノ社製、品番：アンバーライトXAD-2）、誘導増強剤8（芳香族系合成樹脂、オルガノ社製、品番：アンバーライトXAD-4）、又は、誘導増強剤9（芳香族系合成樹脂、オルガノ社製、品番：アンバーライトXAD-16HP）を用いて、実施例2と同様にして、IFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表8に示した。

【0086】

(比較例32)

誘導増強剤を用いなかったことと、OK-432添加血液1.5mLを用いたことを除いては実施例28と同様にして、IFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表8に示した。

【0087】

(比較例33～37)

OK-432を血液に添加しなかったことを除いては、それぞれ実施例28～32と同様にして、IFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表8に示した。

【0088】

【表 8】

	誘導増強剤 かさ体積 (50 $\mu$ L)	材質	OK-432 濃度 (KE/mL)	IFN- $\gamma$ 誘導量 (pg/mL)
実施例 28	誘導増強剤 1	HP50	0.1	360
実施例 29	誘導増強剤 2	XAD2000	0.1	255
実施例 30	誘導増強剤 7	XAD2	0.1	238
実施例 31	誘導増強剤 8	XAD4	0.1	378
実施例 32	誘導増強剤 9	XAD16HP	0.1	205
比較例 32	なし	—	0.1	104
比較例 33	誘導増強剤 1	HP50	—	<10
比較例 34	誘導増強剤 2	XAD2000	—	<10
比較例 35	誘導増強剤 7	XAD2	—	<10
比較例 36	誘導増強剤 8	XAD4	—	<10
比較例 37	誘導増強剤 9	XAD16HP	—	<10

## 【0089】

(実施例 33)

ポリスチレンージビニルベンゼン共重合体の誘導増強剤 8 (芳香族系合成樹脂、オルガノ社製、品番: アンバーライト XAD-4) をかさ体積で 1 mL と、1 KE/mL の OK-432 (ピシバニール、中外製薬社製) と、0.1 容積% ホルマリン (中性緩衝ホルマリン液、和光純薬工業社製) を含有する生理食塩水 1 mL とを混合し、37℃ にて 20 時間、回転混和させて OK-432 を誘導増強剤 8 の粒子表面に物理吸着させた。この後、この粒子を生理食塩水にて充分洗浄した後、かさ体積で 100  $\mu$ L を滅菌済みチューブ (ダイアヤトロン社製、1.5 mL 用) に充填した。

## 【0090】

OK-432 の添加がないこと、及び、血液を 1.4 mL 添加したことを除いては実施例 1 と同様な操作を行い、IFN- $\gamma$  の誘導量を測定した。結果を表 9 に示した。

## 【0091】

(実施例 34)

ホルマリン濃度を 0.5 容積% としたことを除いては実施例 33 と同様にして作製した粒子を得て、実施例 33 と同様にして IFN- $\gamma$  の誘導量を測定した。結果を表 9 に示した。

## 【0092】

## (実施例 35)

ホルマリン濃度を 1.0 容積%としたことを除いては実施例 33 と同様にして作製した粒子を得て、実施例 33 と同様にして IFN- $\gamma$  の誘導量を測定した。結果を表 9 に示した。

## 【0093】

## (実施例 36)

ホルマリン濃度を 2.0 容積%としたことを除いては実施例 33 と同様にして作製した粒子を得て、実施例 33 と同様にして IFN- $\gamma$  の誘導量を測定した。結果を表 9 に示した。

## 【0094】

## (実施例 37)

ホルマリン濃度を 3.0 容積%としたことを除いては実施例 33 と同様にして作製した粒子を得て、実施例 33 と同様にして IFN- $\gamma$  の誘導量を測定した。結果を表 9 に示した。

## 【0095】

## (実施例 38)

ホルマリン濃度を 5.0 容積%としたことを除いては実施例 33 と同様にして作製した粒子を得て、実施例 33 と同様にして IFN- $\gamma$  の誘導量を測定した。結果を表 9 に示した。

## 【0096】

## (実施例 39)

ホルマリン濃度を 10.0 容積%としたことを除いては実施例 33 と同様にして作製した粒子を得て、実施例 33 と同様にして IFN- $\gamma$  の誘導量を測定した。結果を表 9 に示した。

## 【0097】

## (比較例 38)

OK-432 の物理吸着処理をしていない誘導増強剤 8 を使用したこと以外は実施例 33 と同様にして IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 9 に示した。

【0098】

(比較例39)

誘導増強剤8を用いなかったこと、及び、0.1KE/mLのOK-432添加血液を1.5mL用いたことを除いては、実施例33と同様にしてIFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表9に示した。

【0099】

【表9】

	誘導増強剤8 かさ体積 (100 $\mu$ L)	OK-432 濃度 (KE/mL)	IFN- $\gamma$ 誘導量 (pg/mL)
実施例33	ヒマリン0.1%	—	233
実施例34	ヒマリン0.5%	—	261
実施例35	ヒマリン1.0%	—	280
実施例36	ヒマリン2.0%	—	288
実施例37	ヒマリン3.0%	—	212
実施例38	ヒマリン5.0%	—	255
実施例39	ヒマリン10.0%	—	222
比較例38	物理吸着なし	—	<10
比較例39	—	0.1	96

【0100】

(実施例40)

実施例35と同様に作製したOK-432を粒子表面に物理吸着させた誘導増強剤8をかさ体積で4mL血液バッグ(テルモ社製、分離バッグ200mL用)に充填した。健常人から採血して得たヘパリン15IU/mL含有の静脈血50mLをこの血液バッグに導入した。この血液バッグを37℃で24時間、穏やかに攪拌しながらインキュベートした。この血液中のIFN- $\gamma$ 誘導量を実施例1と同様に測定した。結果を表10に示した。

【0101】

(比較例40)

OK-432の物理吸着処理をしていない誘導増強剤8を使用したこと以外は実施例40と同様にしてIFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表10に示した。

【0102】

(比較例41)

誘導増強剤8を用いなかったこと、及び、0.1KE/mLのOK-432添加

血液 50 mL を用いたことを除いては実施例 40 と同様にして IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 10 に示した。

【0103】

【表 10】

	誘導増強剤 8 かさ体積 (4mL)	OK-432 濃度 (KE/mL)	IFN- $\gamma$ 誘導量 (pg/mL)
実施例 40	物理吸着	—	257
比較例 40	物理吸着なし	—	<10
比較例 41	—	0.1	98

【0104】

(実施例 41)

OK-432 を 0.01 KE/mL の濃度で用いたこと、及び、IL-10 を測定したこと以外は実施例 2 と同様にして測定した。結果を表 11 に示した。

【0105】

(比較例 42)

誘導増強剤 1 を添加しなかったこと、及び、OK-432 添加血液 1.5 mL を用いたことを除いては実施例 41 と同様にして IL-10 誘導量を測定した。結果を表 11 に示した。

【0106】

(比較例 43)

OK-432 を血液に添加しなかったことを除いては、実施例 41 と同様にして、IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 11 に示した。

【0107】

【表 11】

	誘導増強剤 1 かさ体積 ( $\mu$ L)	OK-432 の濃度 (KE/mL)	IL-10 誘導量 (pg/mL)		
			被採血者		
			A	B	C
実施例 41	50	0.01	560	285	421
比較例 42	—	0.01	74	39	112
比較例 43	50	—	<10	<10	<10

【0108】

(実施例 42、43)

OK-432の濃度を0.01KE/mL及び0.1KE/mLの2用量にした以外は実施例2と同様にしてIFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表12に示した。

【0109】

(比較例44)

OK-432を添加しなかったことを除いては実施例42と同様にしてIFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表12に示した。

【0110】

(比較例45)

誘導増強剤1を添加しなかったことと、OK-432添加(0.01KE/mL)血液を1.5mL用いたことを除いては実施例42と同様にしてIFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表12に示した。

【0111】

(比較例46)

誘導増強剤1を添加しなかったことと、OK-432添加(0.1KE/mL)血液1.5mL用いたことを除いては実施例43と同様にしてIFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表12に示した。

【0112】

【表12】

	誘導増強剤1 かさ体積 ( $\mu$ L)	OK432 濃度 (KE/mL)	IFN- $\gamma$ 誘導量 (pg/mL)		
			被採血者		
			A	B	C
実施例42	50	0.01	79	355	128
実施例43	50	0.1	267	466	432
比較例44	50	—	<10	12	<10
比較例45	—	0.01	<10	94	59
比較例46	—	0.1	84	176	89

【0113】

(実施例44)

誘導増強剤10としてナイロンウール(和光純薬工業社製)を0.04g(1.5mLチューブに充填したかさ体積として約300 $\mu$ L)用いたこと、及び、OK-432添加血液を1.2mL添加したことを除いては実施例1と同様にして

IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 13 に示した。

【0114】

(実施例 45)

誘導増強剤 11 としてポリエステル不織布 (日本バイリーン社製、品名: EL-5600) を 0.04 g (1 cm $\times$ 3 cm、かさ体積として約 300  $\mu$ L) 用いたこと、及び、OK-432 添加血液を 1.2 mL 添加したことを除いては実施例 1 と同様にして IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 13 に示した。

【0115】

(実施例 46)

誘導増強剤 12 としてポリエステル不織布 (日本バイリーン社製、品名: EW-7180) を 0.04 g (1 cm $\times$ 3 cm、かさ体積として約 220  $\mu$ L) 用いたこと、及び、OK-432 添加血液を 1.28 mL 添加したことを除いては実施例 1 と同様にして IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 13 に示した。

【0116】

(比較例 47)

OK-432 を用いなかったことを除いて実施例 44 と同様にして IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 13 に示した。

【0117】

(比較例 48)

OK-432 を用いなかったことを除いて実施例 45 と同様にして IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 13 に示した。

【0118】

(比較例 49)

OK-432 を用いなかったことを除いて実施例 46 と同様にして IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 13 に示した。

【0119】

(比較例 50)

誘導増強剤を用いなかったこと、及び、OK-432 添加血液 (0.1 KE/mL) を 1.5/mL 用いたことを除いて実施例 44 と同様にして IFN- $\gamma$  誘導

量を測定した。結果を表 13 に示した。

【0120】

【表 13】

	誘導増強剤	OK432 濃度 (KE/mL)	IFN- $\gamma$ 誘導量 (pg/mL)
実施例 44	誘導増強剤 10	0.1	208
実施例 45	誘導増強剤 11	0.1	285
実施例 46	誘導増強剤 12	0.1	257
比較例 47	誘導増強剤 10	—	<10
比較例 48	誘導増強剤 11	—	<10
比較例 49	誘導増強剤 12	—	<10
比較例 50	—	0.1	101

【0121】

(実施例 47)

誘導増強剤 13 (ポリビニルアルコールゲル粒子、粒子径約 1 mm) として、横井弘「PVA 及び PAA の錯体ゲル」(高分子加工 Vol. 40、No. 11、1991 年) に従い、ポリビニルアルコール-Fe (III) 錯体ゲル粒子を製作した。誘導増強剤 13 を生理食塩水に懸濁し、かさ体積で 300  $\mu$ L の誘導増強剤 13 を 1.5 mL 用滅菌チューブに充填した。血液 1.2 mL を添加したことを除いて、実施例 1 と同様にして IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 14 に示した。

【0122】

(比較例 51)

OK-432 を添加しなかったことを除いて実施例 47 と同様にして IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 14 に示した。

【0123】

(比較例 52)

誘導増強剤 13 を用いなかったこと、及び、OK-432 添加血液を 1.5 mL 添加したことを除いて、実施例 47 と同様にして IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 14 に示した。

【0124】



【表 14】

	誘導増強剤 13 かさ体積 ( $\mu\text{L}$ )	OK432 濃度 (KE/mL)	IFN- $\gamma$ 誘導量 (pg/mL)
実施例 47	300	0.1	266
比較例 51	300	—	<10
比較例 52	—	0.1	88

【0125】

## 【発明の効果】

本発明は、上述の構成よりなるので、本発明のサイトカイン誘導材料を、例えば、血液又は血液成分と接触させることにより、従来のサイトカイン誘導剤に比べて、サイトカインを効果的に誘導することができるので、本発明のサイトカイン誘導材料及び誘導用具は、サイトカインの誘導が有効である様々な疾患の治療に好適に用いることができる。

## 【図面の簡単な説明】

## 【図 1】

表面粗さを説明するための模式図であり、凹凸の「山」を説明するための図である。

## 【図 2】

表面粗さにおける凹凸平均間隔  $S_m$  値を説明するための図である。

## 【図 3】

本発明のサイトカイン誘導用具の一例を示す模式的断面図である。

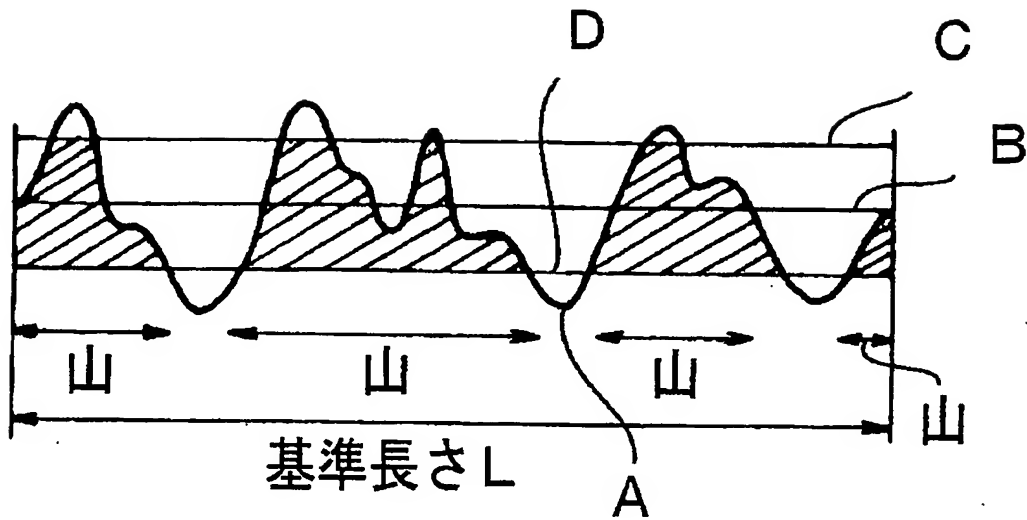
## 【符号の説明】

- 1 導入部
- 2 導出部
- 3 容器
- 4 サイトカイン誘導材料と接触した血液
- 5 サイトカイン誘導材料流出防止機構

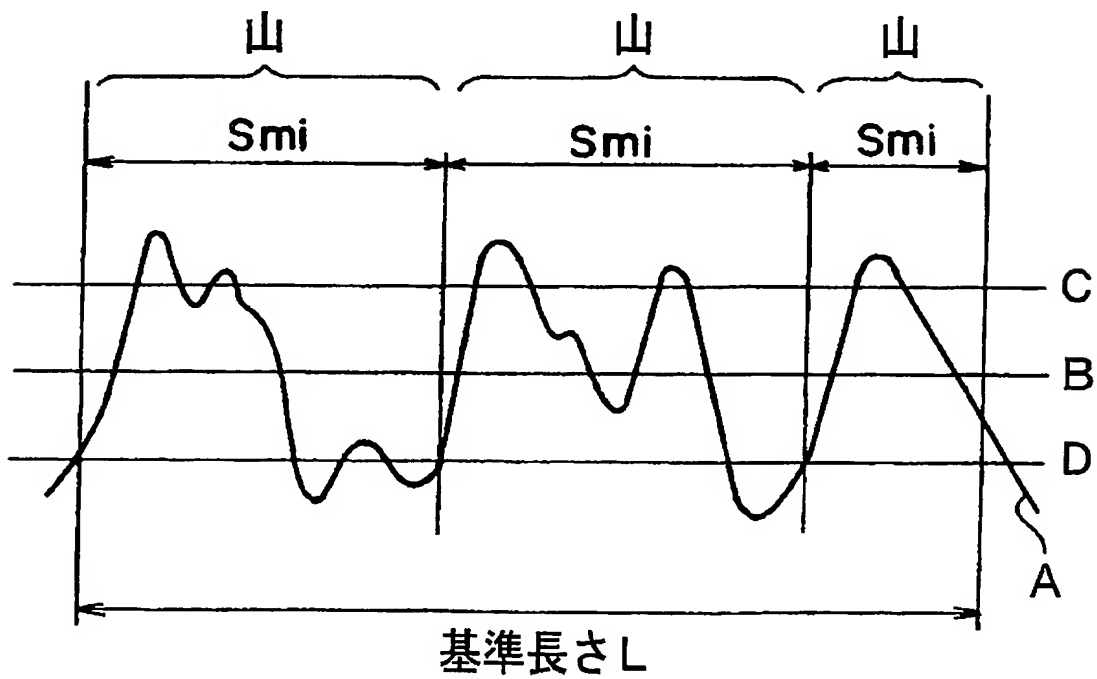
【書類名】

図面

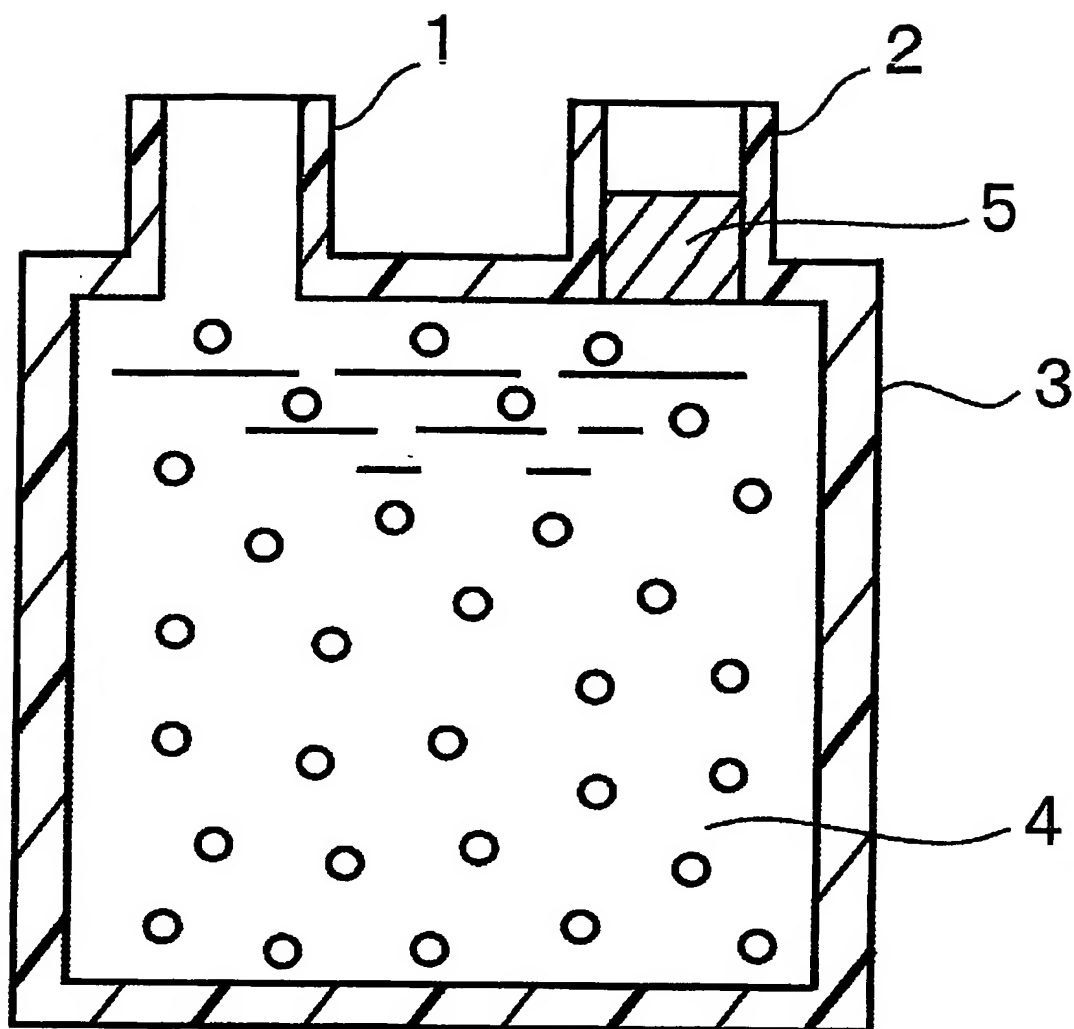
【図 1】



【図 2】



【図 3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 従来のサイトカイン誘導療法に比べてより効果的にサイトカインを誘導し得る新規なサイトカイン誘導材料及びサイトカイン誘導用具を提供する。

【解決手段】 溶連菌及び溶連菌由来成分と、水に不溶性の誘導増強剤とを含むサイトカイン誘導材料。

【選択図】 なし

特願 2003-124344

ページ: 1/E

出願人履歴情報

識別番号

[000002174]

1. 変更年月日  
[変更理由]

住所  
氏名

1990年 8月29日

新規登録

大阪府大阪市北区西天満2丁目4番4号  
積水化学工業株式会社